Jurnal Kimia Andalas, ISSN : 0853-8018
Vol. 2, No. 1, 1995 (19-25)

PENAMBAHAN ION KALSIUM PADA MEDIUM FERMENTASI DAN EKSTRAK KASAR ENZIM SERTA PENGARUHNYA TERHADAP AKTIVITAS α-AMILASE DARI *Aspergillus Oryzae*. L

Marniati Salim

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Telah dilakukan pengukuran aktivitas enzim α amilase dari Aspergillus oryzae dengan penambahan ion kalsium melalui dua perlakuan, pertama penambahan ion kalsium pada media fermentasi, kedua pada ekstrak kasar enzim. Hasil menunjukan peninghatan aktivitas ekstrak hasar enzim yang terjadi dengan cepat pada konsentrasi ion kalsium antara 0,0 - 0,94 M, lebih dari 0,94 M tidak terlihat kenaikan yang tajam, berarti ion kalsium disini berfungsi sebagai kofaktor dan optimum pada konsentrasi 0,94 M.

ABSTRACT

It has been determinated the activity of Aspergillus Oryzae α amylase by the effect of reddition calcium ion through out two assay. First, readdition of calcium into the extracted fermentation and second, readdition directly in to crude enzim. The results showed that the readdition of calcium ion increase rapidly the activity of crude α amylase beetwen the concentration of 0,0 - ,94. Further readdition beetwen the concentration of calcium 0,941 - 1,176 M have no deferences thus, the optimum concentration of readeted calcium as cofactor at 0,941 M.

PENDAHULUAN

Enzim α-amilase terdapat pada hewan, tumbuh-tumbuhan seperti ubi jalar, apel, gandum, pisang dan pada mikroorganisme, seperti *Aspergillus oryzae*, *A niger*, *Bacillus substilis*, dan *B. mycoide* (Faith, 1971). Amilase merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis ikatan glikosida α-1-4 pada polisakarida seperti amilosa, amilopektin, glikogen dan pati menjadi gula. Enzim ini sering dimanfaatkan dalam industri makanan, minuman, industri obat-obatan dan tekstil (Gumbira, 1987). Mengingat kebutuhan akan enzim ini, perlu

dikembangkan penelitian-penelitian agar diperoleh teknik-teknik yang menguntungkan dalam penggunaan enzim tersebut. Satu molekul enzim α-amilase mengikat satu atom kalsium yang berperan sebagai kofaktor (Fisher, 1960). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ion kalsium yang ditambahkan pada medium fermentasi jamur *Aspergillus oryzae* dan ekstrak kasar enzim terhadap aktivitas enzim alfa amilase. Salah satu sumber ion kalsium dapat digunakan garam $CaCl_2$. Untuk enzimatik α-amilase dilakukan dengan pengukuran serapan produk reaksi yang dikatalis oleh α-amilase (maltosa) dengan metoda Somogy-Nelson secara spektrofotometri, dan penentuan kalsium dilakukan secara kompleksometri.

BAHAN DAN METODA

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer, sentrifuga, pH meter, termometer, inkubator, inkas steril, autoklaf, jarum ose dan alat-alat gelas lainnya. Bahan kimianya adalah : dekstrosa, HCl, serum albumin, buffer fosfat, $CaCl_2$, amilum, indikator lugol, reagen arseno molibdat, reagen Nelson, reagen Lowry, maltosa, magnesium klorida, natrium hidroksida, medium agar touge, medium semi sagu padat dan biakan murni *Aspergillus Oryzae*.

Metoda Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 2 cara, yang pertama dengan penambahan ion kalsium pada media fermentasi dan yang kedua dengan menambahkan ion kalsium pada ekstrak kasar enzim yang telah didapatkan. Pengukuran dilakukan pada kondisi pH 5,9, lama inkubasi 40 menit, suhu 5 °C dan konsentrasi substrat 2,5 % dengan metoda Somogy Nelson. Tahap-tahap pengerjaan adalah sebagai berikut :

1. Pembiakan jamur *Aspergillus oryzae*

Setelah diperoleh media agar miring (touge, dekstrosa dan agar bacto) yang telah disterilkan, dilakukan inokulasi dengan jarum ose secara aseptik, kemudian inkubasi jamur tersebut selama enam hari pada suhu kamar.

2. Fermentasi enzim

Jamur *Aspergillus oryzae* disuspensikan kedalam media semi padat (sagu, buffer fosfat pH 5). Kemudian ditentukan fermentasi yang baik mencakup pH, lama fermentasi dan berat sagu yang dipakai sebagai media untuk memperoleh hasil enzim yang banyak.

Pemilihan lama fermentasi yang baik.

Fermentasi dilakukan pada 10 gram media sagu yang telah dihaluskan, tambahkan 40 ml buffer fosfat pH 5, kemudian medium dibiarkan selama ± 48 jam. Inokulasi jamur *Aspergillus oryzae* pada medium semi padat ini kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam inkubator dengan variasi waktu (jam) : 48, 72, 96, 120 dan 144. Untuk pemilihan pH medium, berat sagu tetap 10 gram, pH buffer divariasikan yaitu dari 5 sampai 7,5 dengan internal 0,5 dan untuk komposisi berat sagu divariasikan yaitu 5,6, 7,8, 9, 10, 12 dan 15 gram. Fermentasi dilakukan dengan pH buffer dan lama fermentasi yang telah didapatkan. Untuk setiap lama fermentasi dilakukan ekstraksi enzim (Aziz Darwis dan Sukara, 1990).

Uji dekstrinasi

Hidrolisis amilum membentuk maltosa, dengan cara : 10 ml substrat amilum 0,5% dan 1 ml inkubator lugol dan kemudian dimasukan 10 ml ekstrak enzim. Amati waktu dekstrinasi yang di tandai dengan hilangnya warna biru larutan.

3. Ektrasksi hasil fermentasi

Setelah didapat kondisi fermentasi yang baik, ekstrak enzim yang didapat dipergunakan untuk penentuan aktivitas enzim (penentuan kadar maltosa).

Penambahan ion kalsium pada medium fermentasi variasi ion kalsium yang ditambahkan pada medium fermentasi yaitu 0,0 sampai 5,0 M dengan internal 0,5. Setelah diperoleh eks- trak enzim untuk masing-masing konsentrasi ion kalsium dila- kukan uji dekstrinasi, penentuan aktivitas enzim. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan ekstraksi hasil fermentasi.

Penambahan ion kalsium pada ekstrak kasar enzim α-amilase.

Campurkan 20 ml larutan ion kedalam ekstrak kasar enzim α-amilase, variasi konsentrasi ion kalsium dari 0,0 sampai 5,0 M dengan internal 0,5. Hal ini dilakukan untuk aktivitas enzim dan penentuan kualitas ion kalsium secara kompleksometri.

Pengukuran konsentrasi ion kalsium

10 ml ekstrak kasar enzim, ditambahkan 5 tetes masing-masing KCN 1%, $NH_2OH.HCl$ 5%, $K_4Fe(CN)_6$ 5% dan trietanol amin, lalu tambahkan indikator calcon dan titrasi dengan EDTA. Titik akhir ditandai dengan perubahan warna larutan dari merah violet menjadi biru, sehingga kadar ion kalsium dalam ekstrak dapat ditentukan.

HASIL DAN DISKUSI

1. Setelah diinkubasi selama 6 hari pada suhu kamar, terlihat jamur *Aspergillus oryzae* menghasilkan spora berwarna kuning kecoklatan dan kehijau-hijauan akhirnya berwarna kebutuhan, yang semulanya berwarna putih.

2. Setelah diperoleh kondisi fermentasi enzim α-amilase dan pemilihan dari *Aspergillus oryzae*, lama fermentasi, pH medium dan komposisi berat sagu adalah berturut-turut ± 20 jam, pH 6,5 dan komposisinya 9 gram.

3. Pengamatan uji dekstrinisasi terhadap lama fermentasi seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengamatan Uji Destrinisasi Terhadap Lama Fermentasi

Lama (jam)	Waktu Dekstrinisasi (menit)
72	38'
96	28'
120	12'30"
144	15'5"

Untuk menentukan lama fermentasi dimana *Aspergillus oryzae* menhasilkan enzim α-amilase dalam jumlah yang maksimum, maka dilakukan uji dekstrinisasi yaitu, waktu yang diperlukan oleh enzim α-amilase menghidrolisis substrat amilum menjadi maltosa yang ditandai oleh terjadinya perubahan warna biru menjadi ungu agak kemerahan. Setelah ditambahkan ekstrak kasar dari enzim α-amilase akan terjadi perubahan warna. Pada fasa eksponensial terjadi produksi enzim α-amilase yang terbesar (Aziz dan Sukora, 1990) dan setelah diuji terhadap pH medium fermentasi yang terbentuk pada pH 6,5 seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji dekstrinisasi terhadap ekstrak kasar enzim dari *Aspergillus oryzae* yang dibiakan pada variasi pH medium dan lama fermentasi 120 jam.

pH	Waktu Dekstrinisasi (menit)
5	12'30"
5,5	6'00"
6	2'29"
6,5	2'00"
7	4'30"
7,5	12'25"

Sedangkan waktu uji dekstrinisasi terhadap α-amilase dari *Aspergillus oryzae* yang dibiakan pada medium dengan komposisi sagu yang berbeda memperlihatkan bahwa medium semi padat yang mengandung 9,0 gram sagu memberikan enzim yang terbaik, ditandai dengan singkatnya waktu dekstrinisasi yaitu 1'47". Daya serap sagu terhadap air (larutan buffer) yang dipakai memberikan kelembaban yang sesuai untuk pertumbuhan *Aspergillus oryzae*. Bila kecil dari 9,0 gram, media menjadi terlalu cair, sehingga pertumbuhan menjadi terganggu, demikian pula bila lebih dari 9,0 gram (Tabel 3).

Tabel 3. Uji dekstrinisasi terhadap ekstrak kasar enzim dari *Aspergillus oryzae* yang dibiakan pada berbagai variasi berat sagu pH 6,5, lama fermentasi 120 jam.

Berat sagu (gram)	Waktu dektrinisasi (menit
5	4'
6	3'46"
7	3'30"
8	3'
9	1'47"
10	1'55"
12	2'15"
15	2'25"

4. Sebelum menentukan pengaruh konsentrasi ion kalsium terhadap aktivitas enzim, lebih dulu dilakukan uji aktivitas enzim α-amilase pada kondisi optimal yaitu pH 5,9, suhu 50° lama waktu inkubasi 40 menit dan konsentrasi substrat amilum 2,5 %. Pengaruh ion kalsium terhadap aktivitas enzim α-amilase yang ditambahkan pada media fermentasi dan ekstrak kasar enzim ditentukan pada kondisi optimum aktivitas α-amilase, hasilnya seperti terlihat pada Tabel 4.

Pengaruh penambahan ion kalsium kedalam ekstrak kasar enzim lebih tinggi dibandingkan dengan pengaruh penambahan ion Ca^{+} kedalam medium fermentasi terhadap aktivitas enzim α-amilase. Hal ini mungkin disebabkan karena ion kalsium pada media fermentasi diserap oleh jamur *Aspergillus oryzae* dan nutrisi.

Tabel 4. Pengaruh penambahan ion kalsium pada medium fermentasi enzim dan ekstrak kasar enzim. Pengujian aktivitas α-amilase dilakukan pada kondisi optimum untuk aktivitas α-amilase, yaitu pH 5,9, suhu 50° dan waktu inkubasi 40 menit.

Konsentrasi ion Ca^{++} (M)	Aktivitas (unit)	
	a	b
0	99,59	99,59
0,118	100,00	108,00
0,235	100,25	109,00
0,353	100,55	111,50
0,470	100,95	113,50
0,588	102,00	115,05
0,705	103,08	120,00
0,823	105,04	123,00
0,941	106,05	124,05
1,058	106,08	124,07
1,176	106,09	124,09

Keterangan :
a = penambahan ion kalsium pada medium fermentasi enzim
b = penambahan ion kalsium pada ekstrak kasar enzim

5. Hasil pengukuran konsentrasi ion kalsium yang terukur secara kompleksometri dapat dilihat dari Tabel 5 dibawah ini :

Tabel 5. Perbandingan konsentrasi ion kalsium yang terukur secara kompleksometri terhadap ion kalsium yang ditambahkan pada perlakuan (a) pada medium fermentasi dan (b) pada ekstrak kasar enzim α-amilase.

Konsentrasi ion Ca^{++} (M) Yang Ditambahkan	Konsentrasi Ca^{++} Terukur (M)	
	a	b
0,0	0,007	0,007
0,118	0,115	0,125
0,235	0,230	0,240
0,353	0,348	0,360
0,470	0,460	0,480
0,588	0,580	0,595
0,705	0,698	0,715
0,823	0,815	0,835
0,941	0,930	0,950
1,058	0,025	0,070
1,176	0,150	1,180

Dengan ditentukannya kondisi ion kalsium secara kompleksometri maka penyebab turunnya aktivitas α-amilase selama fermentasi enzim dapat diterangkan, yaitu karena berkurangnya konsentrasi ion kalsium yang merupakan kofaktor bagi enzim α-amilase. Seperti diketahui bahwa kofaktor dibutuhkan untuk aktivitas katalitik enzim.

Pada penelitian ini konsentrasi ion kalsium yang baik untuk mendapatkan enzim α-amilase adalah 0,941 M. Bila [Ca^+] kurang dari 0,941 M, maka enzim belum jenuh terhadap kofaktor berarti masih ada daerah yang aktif, dan konsentrasi 0,941 M, dapat dikatakan enzim α-amilase mendekati lewat jenuh, sehingga peningkatan aktivitas enzim α-amilase hampir tidak ada atau peran kofaktor disini sudah berkurang sesuai dengan peneltian Miyagawa, 1960.

KESIMPULAN

1. Uji dekstrinisasi terhadap α-amilase setelah fermentasi selama 120 jam, dengan waktu dekstrinisasi 12 menit 30 detik, pH medium 6,5 dengan waktu dekstrinisasi 2 menit dan variasi berat sagu yang baik pada komposisi 9 gram.
2. Penambahan ion kalsium 0,941 M pada medium fermentasi dan ekstrak kasar enzim α-amilase aktivitas enzim masing-masing adalah 106,05 dan 124,05 unit.
3. Penambahan ion kalsium baik pada medium fermentasi maupun ekstrak kasar enzim memberikan harga aktivitas yang lebih besar dibandingkan sebelum penambahan ion kalsium.

DAFTAR PUSTAKA

1. Faith W.T., L.E. Neubeck and E.T. Reese, Production and Application of Enzymes, Adv., Biochem. Eng., 1971, 1, 77-111.

2. Gumbira Sa'id E., Penerapan Teknologi Fermentasi Pusat Antar Universitas, Bioteknologi, IPB Bogor, 1987.

3. Fisher E.H., and E.A. Stein, α-Amylase, The Enzymes, Academic Press, 1960, 4, 313.

4. Winarno F.G., Enzim Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 1981.

5. Annuziato M.T., dan Mudgett, Production of Calactosidaciae from *Aspergillus oryzae* Grown in solid state culture, *J. of Food Science*, 5, 1-6, 1979.

6. Miyagawa K., Sannoe K., dan Keizo Suzuki, *Bacillus Substilis* α-amilase Against Pressure Inactivation by Ca^{++} ion. Arch Biochem. Biophys, 1960, 10,432.